

## Bibliographic Fields

## Document Identity

(19)【発行国】

日本国特許庁(JP)

(12)【公報種別】

公開特許公報(A)

(11)【公開番号】

特開2001-9274(P2001-9274A)

(43)【公開日】

平成13年1月16日(2001. 1. 16)

## Public Availability

(43)【公開日】

平成13年1月16日(2001. 1. 16)

## Technical

(54)【発明の名称】

被覆イオン交換体とその製造方法、及び有用成分の分離精製方法

(51)【国際特許分類第7版】

B01J 20/24

B01D 15/04

B01J 20/26

20/28

20/30

41/06

47/00

// C12N 1/00

【FI】

B01J 20/24 C

Z

B01D 15/04

B01J 20/26 H

Z

20/28 A

(19) [Publication Office]

Japan Patent Office (JP)

(12) [Kind of Document]

Unexamined Patent Publication (A)

(11) [Publication Number of Unexamined Application]

Japan Unexamined Patent Publication 2001 - 9274  
(TRANSLATION STALLEDP2001 - 9274A)

(43) [Publication Date of Unexamined Application]

Heisei 13 year January 16 day (2001.1 . 16)

(43) [Publication Date of Unexamined Application]

Heisei 13 year January 16 day (2001.1 . 16)

(54) [Title of Invention]

COATING ION EXCHANGER AND  
MANUFACTURING METHOD、AND SEPARATION  
AND PURIFICATION METHOD OF USEFUL  
COMPONENT

(51) [International Patent Classification, 7th Edition]

B01J 20/24

B01D 15/04

B01J 20/26

20/28

20/30

41/06

47/00

//C12N 1/00

【FI】

B01J 20/24 C

Z

B01D 15/04

B01J 20/26 H

Z

20/28 A

JP2001009274A

2001-1-16

20/30

20/30

41/06

41/06

47/00 A

47/00 A

C12N 1/00 K

C12N 1/00 K

【請求項の数】

[Number of Claims]

7

7

【出願形態】

[Form of Application]

OL

OL

【全頁数】

[Number of Pages in Document]

7

7

【テーマコード(参考)】

[Theme Code (For Reference)]

4B0654D0174G066

4 B0654D0174G066

【Fターム(参考)】

[F Term (For Reference)]

4B065 AA26X AA88X AA90X BC01 BD14  
BD39 CA24 CA60 4D017 AA09 BA07 CA12  
CA13 CA14 CA17 CB01 DA02 EA01 EB02  
4G066 AC01B AC01D AC02B AC22D AC23D  
AC24D AC26D AC31D AE10B BA09 BA20  
BA36 CA54 DA12 EA01 FA11

4 B065 AA26X AA88X AA90X BC 01 BD14 BD39 CA24  
CA60 4D017 AA09 BA 07 CA12 CA<SP>13</SP>C A14  
CA17 CB01 DA02 EA01 EB02 4G066 AC01 BA C01D  
AC02 BA C22D AC23D AC24D AC26D AC31 D AE10  
BBA 09 BA 20 BA 36 CA54 DA12 EA01 FA11

**Filing**

【審査請求】

[Request for Examination]

未請求

Unrequested

(21)【出願番号】

(21) [Application Number]

特願平11-186437

Japan Patent Application Hei 11 - 186437

(22)【出願日】

(22) [Application Date]

平成11年6月30日(1999. 6. 30)

1999 June 30 days (1999.6. 30)

**Parties**

**Applicants**

(71)【出願人】

(71) [Applicant]

【識別番号】

[Identification Number]

000002071

000002071

【氏名又は名称】

[Name]

チッソ株式会社

CHISSO CORP. (DB 69-064-2582)

【住所又は居所】

[Address]

大阪府大阪市北区中之島3丁目6番32号

Osaka Prefecture Osaka City Kita-ku Nakanoshima 3-6-32

(71)【出願人】

(71) [Applicant]

【識別番号】

[Identification Number]

JP2001009274A

2001-1-16

599090888

【氏名又は名称】

近藤 昭彦

【住所又は居所】

兵庫県神戸市灘区篠原伯母野山町1丁目1番  
2-806号

Inventors

(72)【発明者】

【氏名】

近藤 昭彦

【住所又は居所】

兵庫県神戸市灘区篠原伯母野山町1丁目1番  
2-806号

(72)【発明者】

【氏名】

戸所 正美

【住所又は居所】

熊本県水俣市築地4番318号

(72)【発明者】

【氏名】

畑 英之

【住所又は居所】

熊本県水俣市陣内2丁目11番1号

Abstract

(57)【要約】

【課題】

目的とする有用生成物の分離と精製を、同時に  
且つ効率よく行うダウンストリームプロセスを可  
能とするイオン交換体の提供。

【解決手段】

イオン交換体の表面を非イオン性物質で被覆し  
た被覆イオン交換体。

Claims

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

イオン交換体の表面を非イオン性物質で被覆し  
た被覆イオン交換体。

599090888

[Name]

KONDO AKIHIKO

[Address]

Hyogo Prefecture Kobe City Nada-ku Shinohara aunt field  
crest town 1 - 12 - 806

(72) [Inventor]

[Name]

Kondo Akihiko

[Address]

Hyogo Prefecture Kobe City Nada-ku Shinohara aunt field  
crest town 1 - 12 - 806

(72) [Inventor]

[Name]

Todokoro Masami

[Address]

Kumamoto Prefecture Minamata City Tsukiji 4-3 18 number

(72) [Inventor]

[Name]

field Hideyuki

[Address]

Kumamoto Prefecture Minamata City Jinnai 2-Chome 11-1

(57) [Abstract]

[Problems to be Solved by the Invention]

Separating and refining useful product which is made  
objective, simultaneously and offer of ion exchanger which  
makes Dounce tree  $\Delta$  process which is done efficiently  
possible.

[Means to Solve the Problems]

Coating ion exchanger. which covered surface of ion  
exchanger with nonionic substance

[Claim(s)]

[Claim 1]

Coating ion exchanger. which covered surface of ion

た被覆イオン交換体。

【請求項 2】

イオン交換体がアニオン交換体である請求項 1 に記載の被覆イオン交換体。

【請求項 3】

非イオン性物質が多糖、ポリオール、ポリアミド、ポリエステル、ポリウレタン、ポリエーテル、およびポリエーテルスルホンから選ばれた 1 種以上である請求項 1 または 2 に記載の被覆イオン交換体。

【請求項 4】

イオン交換体の平均粒径が 100~1000  $\mu\text{m}$  の範囲である請求項 1~3 の何れか 1 項に記載の被覆イオン交換体。

【請求項 5】

イオン交換体の表面に非イオン性物質の被覆層を生成させる被覆イオン交換体の製造方法。

【請求項 6】

請求項 1~4 の何れか 1 項に記載の被覆イオン交換体を用いた有用成分の分離精製方法。

【請求項 7】

請求項 1~4 の何れか 1 項に記載の被覆イオン交換体を充填したカラムを用いた有用成分の分離精製方法。

Specification

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、被覆イオン交換体とその製造方法、及び有用成分の分離精製方法に関する。

更に詳しくは、イオン交換体の表面を非イオン性物質で被覆した被覆イオン交換体とその製造方法、及び有用成分の分離精製方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

タンパク質、酵素、核酸、多糖、脂質などのバイオ生産物の生産プロセスは、生化学反応、酵素反応などによる粗原料の生産段階であるアップ

exchanger with nonionic substance

[Claim 2]

Coating ion exchanger, which is stated in Claim 1 where ion exchanger is the anion exchanger

[Claim 3]

Coating ion exchanger, which is stated in Claim 1 or 2 which is a one kind or more where nonionic substance is chosen from polysaccharide, polyol, polyamide, polyester, polyurethane, polyether, and polyether sulfone

[Claim 4]

Either of Claim 1~3 where average particle diameter of ion exchanger is range of 100 -1000;  $\mu\text{m}$  coating ion exchanger, which is stated in one claim

[Claim 5]

manufacturing method, of coating ion exchanger which forms coating layer of nonionic substance in surface of ion exchanger

[Claim 6]

Either of Claim 1~4 separation and purification method of useful component which uses coating ion exchanger which is stated in one claim.

[Claim 7]

Either of Claim 1~4 coating ion exchanger which is stated in one claim separation and purification method of useful component which uses column which is filled.

[Description of the Invention]

[0001]

[Technological Field of Invention]

this invention regards coating ion exchanger and manufacturing method, and separation and purification method of useful component.

Furthermore details regard coating ion exchanger and manufacturing method, and the separation and purification method of useful component of covering surface of ion exchanger with the nonionic substance.

[0002]

[Prior Art]

manufacturing process of protein, enzyme, nucleic acid, polysaccharide, lipid or other bio product is divided with into up stream process which is a production stage of starting

ストリームプロセスと、目的有用成分の分離・精製段階であるダウンストリームプロセスとに分けられる。

アップストリームプロセスによって得られる培養液や抽出液などの粗原料には、目的とする有用成分以外に数多くの目的外物質が含まれることから、高い純度で目的有用成分を得るためには、種類の異なる複数の分離プロセスが必要であった。

目的有用成分の種類や該成分に求められる純度によっては、目的有用成分の分離・精製段階であるダウンストリームプロセスの処理コストが、全生産コストの大半を占める場合もあることから、バイオ生産物の生産プロセスにおけるダウンストリームプロセスの効率は、近年益々重要視されてきている。

[0003]

このような背景から、現在ダウンストリームプロセスを簡略化する試みがなされている。

具体的には、まず、細胞や菌体を分離していない培養液を流動床のイオン交換体に添加して目的成分のみを分離、精製する方法(以下「流動床法」と記述する)を挙げることができる。

一方、培養液からの目的有用成分の分離・精製を、イオン交換体を充填したカラムを用いて行う方法(以下「カラム法」と記述する)も考えられている。

この方法であれば、設備の一部改良により現有設備を使用することが可能であり、設備コストの面からは有利である。

しかしながら、これらの方法を実用化するためには、カラムに充填するイオン交換体は細胞が通過可能な程度の間隙を有することが必要であり、更に、該イオン交換体には細胞を吸着し難く、カラムが目詰まりしにくい性質が求められる。

[0004]

【発明が解決しようとする課題】

残念なことに、流動床法においてはSTREAMLINE(商品名、アマシャムファルマシアバイオテック株式会社)等の特別な装置が必要となる。

material roughly with biochemical reaction, enzymatic reaction etc and Dounce tree  $\Delta$  process which is a separation and purification stage of objective useful component.

fermentation broth and extracted liquid or other which are acquired with up stream process roughly, in order from fact that substance outside objective is included many other than useful component which is made objective, to obtain objective useful component with high purity, separation process of plural where kind differs was necessary in starting material.

With kind of objective useful component and purity which is sought from the said component, when process cost of Dounce tree  $\Delta$  process which is a separation and purification stage of objective useful component, majority of all manufacturing cost is occupied, from fact that it is, efficiency of Dounce tree  $\Delta$  process in manufacturing process of the bio product has been more and more attached importance recently.

[0003]

From this kind of background, attempt which presently simplifies the Dounce tree  $\Delta$  process has done.

Concretely, first, adding fermentation broth which does not separate cell and cell mass to ion exchanger of fluidized bed, can list method (Below "fluidized bed method" with you describe.) which separation and purification it does only objective component.

On one hand, also method (Below "column method" with you describe.) which does ion exchanger making use of the column which is filled is thought of separation and purification of objective useful component from the fermentation broth.

If it is this method, uses existing facility with part improvement of the facility being possible, it is profitable from aspect of the facilities cost.

But, in order to utilize these method, ion exchanger which is filled in the column cell has gap of passable extent, being necessary, furthermore, it can seek to said ion exchanger property where to be difficult to adsorb, column clogging is difficult to do cell.

[0004]

[Problems to be Solved by the Invention]

Regrettable especially, STR EAML INE (tradename, Amersham Pharmacia bio tech KK) or other special equipment becomes necessary regarding fluidized bed method.

新規に導入する場合には比較的高価な分離設備を購入する必要があり、ダウンストリームプロセスにかかるコストを低減すると云うもてきにはそぐわない場合が多かった。

また、従来のイオン交換体は細胞をも吸着する傾向が強いことから、カラム法の場合には、用いるイオン交換体が、例えば細胞が通過する間隙を持っている場合であっても、カラムが目詰まりし易い傾向にあった。

更に、これら何れの方法においても、前述のように従来のイオン交換体自体は目的有用物質とともに細胞まで吸着することから、培養液から目的とする有用生成物の分離と精製を、同時に且つ効率よく行うダウンストリームプロセスは確立されていなかった。

【0005】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは従来技術の問題点に鑑み鋭意検討を重ねた結果、イオン交換体の表面を非イオン性物質で被覆した被覆イオン交換体は、細胞の吸着率が低く、且つ目的有用成分の吸着率が高いことから、該被覆イオン交換体を用いれば、培養液から目的とする有用生成物の分離と精製を、同時に且つ効率よく行うダウンストリームプロセスが可能となることを見出し、この知見に基づいて本発明を完成させた。

【0006】

本発明は下記の(1)~(7)の構成を有する。

イオン交換体の表面を非イオン性物質で被覆した被覆イオン交換体。

(2)イオン交換体がアニオン交換体である前記第1項に記載の被覆イオン交換体。

(3)非イオン性物質が多糖、ポリオール、ポリアミド、ポリエステル、ポリウレタン、ポリエーテル、およびポリエーテルスルホンから選ばれた1種以上である前記第1または2項に記載の被覆イオン交換体。

(4)イオン交換体の平均粒径が100~1000 $\mu$ mの範囲である前記第1~3項の何れか1項に記載の被覆イオン交換体。

(5)イオン交換体の表面に非イオン性物質の被覆層を生成させる被覆イオン交換体の製造方法。

When it introduces into novel, says  $\Delta$  in coming that relatively it is necessary to purchase expensive separation facility, it decreases the cost which depends on Dounce tree  $\Delta$  process, when it is not suited was many.

In addition, conventional ion exchanger even when cell adsorbs from fact that tendency which is strong, it is a column method, ion exchanger which is used, compares and even with when it has gap which cell can pass, column was in tendency which clogging it is easy to do.

Furthermore, regarding to these whichever method, aforementioned way as for conventional ion exchanger itself with objective useful substance from fact that it adsorbs, simultaneously and as for Dounce tree  $\Delta$  process which is done efficiently it had not been established separating and refining the useful product which is made objective from fermentation broth, to cell.

【0005】

【Means to Solve the Problems】

You consider these inventors to problem of Prior Art and as for result of repeating diligent investigation, as for coating ion exchanger which covered the surface of ion exchanger with nonionic substance, adsorption ratio of cell is low, if from fact that at same time adsorption ratio of objective useful component is high, said coating ion exchanger is used, separating and refining useful product which is made objective from fermentation broth, Becomes simultaneously and Dounce tree  $\Delta$  process which is done efficiently possible, you discovered, you completed this invention on basis of this knowledge.

【0006】

this invention description below (1) - has constitution of (7).

Coating ion exchanger. which covered surface of ion exchanger with nonionic substance

Coating ion exchanger. which is stated in aforementioned Claim 1 where (2) ion exchanger is anion exchanger

Coating ion exchanger. which is stated in aforementioned first or the Claim 2 which is a one kind or more where (3) nonionic substance is chosen from polysaccharide, polyol, polyamide, polyester, polyurethane, polyether, and polyether sulfone

Either of aforementioned first~Claim 3 where average particle diameter of (4) ion exchanger is range of 100 - 1000 $\mu$ m coating ion exchanger. which is stated in the one claim

manufacturing method. of coating ion exchanger which forms coating layer of nonionic substance in surface of (5) ion exchanger

(6)請求項 1~4 の何れか 1 項に記載の被覆イオン交換体を用いた有用成分の分離精製方法。

(7)前記第 1~4 項の何れか 1 項に記載の被覆イオン交換体を充填したカラムを用いた有用成分の分離精製方法。

【0007】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明に用いるイオン交換体は、カチオン交換体、アニオン交換体の何れでも良いが、細胞は主に負電荷を帯びているので、アニオン交換体であることが好ましい。

本発明で用いるイオン交換体は、セルロース、酢酸セルロース、アガロース、デキストラン、キチン、キトサン等の多糖から選ばれた 1 種以上を原料として得られたもの、スチレン-ジビニルベンゼン共重合体、ポリビニルアルコール、ポリアクリルアミド、シリカゲル等の合成樹脂から選ばれた 1 種以上を原料として得られたもの、あるいは前述の多糖から選ばれた 1 種以上と合成樹脂から選ばれた 1 種以上とを原料として得られたものの何れであつてもよい。

【0008】

本発明の非イオン性物質は、多糖、ポリオール、ポリアミド、ポリエステル、ポリウレタン、ポリエーテル、ポリエーテルスルホン等から選ばれた 1 種以上であり、この中でも医薬品等の精製に使用する場合には、天然物である多糖であることが好ましい。

【0009】

多糖としてはセルロース、酢酸セルロース、アガロース、デキストラン、キチン、キトサン、でん粉、プルラン等を挙げることができる。

【0010】

本発明の被覆イオン交換体は、イオン交換体の表面に非イオン性物質の被覆層を生成させる事によって製造することができる。

本発明に用いることができる被覆層の生成方法は、特に限定されるものではなく、該非イオン性物質のジメチルスルホキシド溶解液若しくはジメチルホルムアミド溶解液を用いて、イオン交換体の表面で該非イオン性物質を析出させる方法や、重合若しくは縮合後は該非イオン性物質を形成する反応性モノマーを、イオン交換体表面で重合、縮合させる方法のいずれでも良い。

Either of (6) Claim 1~4 separation and purification method of useful component which uses thecoating ion exchanger which is stated in one claim .

Either of (7) aforementioned first~Claim 4 coating ion exchanger which isstated in one claim separation and purification method of useful component which uses column which is filled.

【0007】

Below, this invention is explained in detail.

ion exchanger which is used for this invention is good with whichever of the cation exchanger、 anion exchanger, but because cell has negative charge mainly, it is a anion exchanger, itis desirable .

As for ion exchanger which is used with this invention, those which acquire the one kind or more which is chosen from cellulose、 cellulose acetate、 agarose、 dextran、 chitin、 chitosan or other polysaccharide as starting material. Those which acquire one kind or more which is chosen from styrene-divinyl benzene copolymer、 polyvinyl alcohol、 polyacrylamide、 silica gel or other synthetic resin as the starting material. Or it is good with whichever of those which acquire one kind or more which is chosen from one kind or more and synthetic resin which are chosen from theaforementioned polysaccharide as starting material.

【0008】

nonionic substance of this invention when with one kind or more which is chosen from the polysaccharide、 polyol、 polyamide、 polyester、 polyurethane、 polyether、 polyether sulfone etc, even among these you use for drug or other refining, is polysaccharide which is a natural product, it is desirable .

【0009】

cellulose、 cellulose acetate、 agarose、 dextran、 chitin、 chitosan、 starch、 pullulan etc can be listed as polysaccharide.

【0010】

It can produce coating ion exchanger of this invention, by fact that the coating layer of nonionic substance is formed in surface of ion exchanger.

preparation method of coating layer which can be used for this invention is notsomething which especially is limited, method of precipitating the said nonionic substance with surface of ion exchanger making use of dimethyl sulfoxide dissolved liquid or dimethylformamide dissolved liquid of said nonionic substance. After polymerization or condensation with ion exchanger surface youpolymerize and it is good with whichever of method which condenses reactive

で重合、縮合させる方法のいずれでも良い。

イオン交換体の表面を多糖で被覆する場合は、多糖のジメチルスルホキシド溶解液やジメチルホルムアミド溶液を用いて、イオン交換体表面で析出させる方法が好ましい。

【0011】

以下、該被覆層の精製方法について具体的に述べる。

該非イオン性物質を用いて被覆層を生成させる場合には、該非イオン性物質と、該非イオン性物質の溶剤であるジメチルスルホキシドやジメチルホルムアミドとを溶解しない分散媒(例えばヘプタンやベンゼンなど)中に該イオン交換体を入れ、次いで、該分散媒に該非イオン性物質のジメチルスルホキシド溶解液若しくはジメチルホルムアミド溶解液を滴下し、その後、該非イオン性物質の溶剤であるジメチルスルホキシドやジメチルホルムアミドを溶解しないか、極僅かしか溶解しない溶解特性を有する溶媒(例えば水やメタノールなど)を滴下することにより、本発明の被覆イオン交換体を得ることができる。

以下、該被覆層の精製方法について具体的に述べる。

【0012】

一方、前述の反応性モノマーをイオン交換体表面で重合、縮合させ被覆層を生成させる場合には、重合開始剤を担持させたイオン交換体と該反応性モノマーとを重合開始剤を溶解しない溶媒であるヘプタンやベンゼンなどに入れ、該溶媒中の該反応性モノマーをイオン交換体表面で重合させる事によって得ることができる。

以上の様な方法で被覆した場合、原料イオン交換体の乾燥重量に対して100%以上の被覆を行う事が可能であるが、本発明においては1%~10%の被覆量で十分であり、好ましくは2.5%~5%の被覆量であることが望ましい。

【0013】

本発明に使用するイオン交換体の形状は特に限定されるものではないが、球状であることが好ましく、その形状が真球に近い形状であるほど、本発明の被覆イオン交換体をカラムに充填した際の均一性が高まり、目的有用成分の分離能力が向上する。

【0014】

monomer which forms said nonionic substance.

When surface of ion exchanger is covered with polysaccharide, method which is precipitated with ion exchanger surface making use of dimethyl sulfoxide dissolved liquid and the dimethylformamide solution of polysaccharide, is desirable.

【0011】

You express concretely below, concerning purification method of said coating layer.

When coating layer is formed making use of said nonionic substance, said ion exchanger is inserted in dispersion medium (for example heptane and benzene etc) which does not melt dimethyl sulfoxide and dimethylformamide which are a solvent of said nonionic substance and said nonionic substance, next, dimethyl sulfoxide dissolved liquid or the dimethylformamide dissolved liquid of said nonionic substance are dripped in said dispersion medium, after that, aren't the dimethyl sulfoxide and dimethylformamide which are a solvent of said nonionic substance melted?, Extremely, coating ion exchanger of this invention can be acquired barely only by dripping solvent (for example water and methanol etc) which possesses dissolution characteristic which is not melted.

You express concretely below, concerning purification method of said coating layer.

【0012】

On one hand, with ion exchanger surface polymerizing and condensing the aforementioned reactive monomer when it forms coating layer, you insert ion exchanger and said reactive monomer which bearing it does polymerization initiator in heptane and benzene etc which are a solvent which does not melt polymerization initiator, you can acquire by fact that you polymerize said reactive monomer in said solvent with ion exchanger surface.

When like above it covered with method, it is possible to cover 100% or more vis-a-vis dried weight of starting material ion exchanger, but regarding to the this invention, with fully, it is a coating amount of preferably 2.5%~5% with 1% - 10% coating amount, it is desirable.

【0013】

shape of ion exchanger which is used for this invention is not something which especially is limited. It is a spherical shape, it is desirable, coating ion exchanger of extent and this invention which are a shape where shape is close to perfect. sphere case where it is filled in column uniformity increases, the separation capacity of objective useful component improves.

【0014】



本発明に使用するイオン交換体の平均粒径は、小さいほど目的物質の吸着能力は高くなる傾向にあるが、カラム法の場合、イオン交換体の粒径が小さくなりすぎると、分離精製を行う際にカラムが目詰まりを起こしやすくなることから、 $100\mu\text{m}$ ~ $1000\mu\text{m}$ であることが好ましい。

更に好ましくは  $200\mu\text{m}$ ~ $350\mu\text{m}$  である。

#### [0015]

本発明の分離精製方法は、本発明の被覆イオン交換体を用いた有用成分の分離精製方法であれば、いかなる工程を有するものであってもよい。

具体的には、前述の流動床法、カラム法を挙げることができる。

本発明の分離精製方法においては、細胞の吸着率が低く、且つ目的有用成分の吸着率が高い本発明の被覆イオン交換体を用いることから、培養液からの有用生成物の分離と精製を、同時に且つ効率よく行うことが可能である。

#### [0016]

更に、本発明の被覆イオン交換体を充填したカラムを用いた有用成分の分離精製方法であれば、現在使用しているカラムのフィルター部分を交換するだけで応用可能であり、流動床法に必要な、STREAMLINE(商品名、アマシャムファルマシアバイオテック株式会社)等の特別な装置を導入する必要がなく好ましい。

#### [0017]

本発明で云うところの培養液とは、細胞或いは細胞の破砕物と目的とする有用成分とを含有する細胞懸濁液であり、具体的には、動物、植物、昆虫の細胞培養液、あるいは微生物の培養液、あるいは血液などを挙げることができる。

また、有用成分とは蛋白質、核酸、多糖などのことである。

#### [0018]

本発明の分離精製方法に供する細胞懸濁液、更に目的とする有用成分は特に限定されるものではない。

本発明の分離精製法であれば、菌体の分離が不要で、吸着、洗浄、溶出操作が1段階で可能

As for average particle diameter of ion exchanger which is used for this invention, when it is small, as for adsorptive capacity of object substance there is a tendency which becomes high, but in case of column method, when particle diameter of ion exchanger becomes too small, column clogging to happen from fact that it becomes easy, is  $100\mu\text{m}$ ~ $1000\mu\text{m}$  occasion where separation and purification is done, it is desirable.

Furthermore it is a preferably  $200\mu\text{m}$ ~ $350\mu\text{m}$ .

#### [0015]

separation and purification method of this invention if it is a separation and purification method of useful component which uses coating ion exchanger of this invention, may be something which possesses what step.

Concretely, aforementioned fluidized bed method, column method can be listed.

Regarding to separation and purification method of this invention, adsorption ratio of cell is low, from fact that coating ion exchanger of this invention where at same time adsorption ratio of objective useful component is high is used, it separates useful product from fermentation broth and it refines, simultaneously and efficiently, it is possible.

#### [0016]

Furthermore, just exchanges filter portion of column which if it is a separation and purification method of useful component which uses column which is filled, presently uses coating ion exchanger of this invention with applicable, with the fluidized bed method necessity, necessity to introduce STR EAML INE (tradename, Amersham Pharmacia bio tech KK) or other special equipment not to be, it is desirable.

#### [0017]

fermentation broth of place as it is called in this invention, with cell suspension which contains useful component which is made pulverized matter and objective of the cell or cell, concretely, cell culture liquid of animal, plant, insect or the fermentation broth, or blood etc of microorganism etc can be listed.

In addition, useful component is protein, nucleic acid, polysaccharide or other thing.

#### [0018]

cell suspension, which is offered to separation and purification method of this invention furthermore useful component which is made objective is not something which especially is limited.

If it is a separation and purification method of this invention, separation of cell mass being unnecessary, adsorption,

となり、精製操作の簡略化が可能であることから、近年一般的になってきた伝子組み替えによる、大腸菌等の微生物を使用したタンパク質、酵素の大量発現、大量生産に用いられることが好ましい。

以下、本発明について実施例及び比較例を用いて詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0019】

#### 【実施例】

##### 1. 被覆イオン交換体の調整

実施例 1(被覆イオン交換体 A-m、A-c、A-ec の調製)

##### 1 被覆イオン交換体 A-m

ヘプタン 100ml の入った、容量 500ml のセパラブルフラスコに、粒径が 60~125  $\mu$ m の範囲にあるセルロファイン Q40ec(商品名、チッソ(株)製)の乾燥品 10g をいれパドルを使用して 170rpm の速度で攪拌した。

次いで、該セパラブルフラスコに、1%三酢酸セルロースジメチルスルホキシド溶液 25ml を 1 時間にかけて滴下した。

滴下終了後、メタノール 50ml を 30 分間かけて滴下した。

該セパラブルフラスコの内容液をブフナーロートでろ過して、該液内に生成したゲル状物を回収した。

回収した該ゲル状物を 150ml の純水を用い、洗浄・ろ過を 3 回繰り返した。

次いで、0.5mol/l の水酸化ナトリウム水溶液 200ml 入れた 500ml セパラブルフラスコに、洗浄後の該ゲル状物をいれ 30 deg C で一夜攪拌した。

攪拌終了後、純水洗浄とブフナーロートでのろ過を、ろ過液が中性になるまで繰り返し、被覆イオン交換体 A-m を得た。

##### 2 被覆イオン交換体 A-c

粒径が 125~250  $\mu$ m の範囲にあるセルロファイン Q40ec(商品名、チッソ(株)製)を用いた以外は、1 被覆イオン交換体 A-m の調整方法に準じて被覆イオン交換体 A-c を調製した。

washing and elution operation being single step, it becomes possible, from fact that simplification of purification operation is possible, with transmission child rearrangement which recently becomes generally, it is used for large scale revelation and mass production of protein, enzyme which uses E. coli or other microorganism, it is desirable.

Below, concerning this invention you explain in detail making use of the Working Example and Comparative Example, but this invention is not something which is limited in these Working Example.

【0019】

#### [Working Example(s)]

##### 1. Adjustment of coating ion exchanger

Working Example 1 (Manufacturing coating ion exchanger A-m, A-c, A-ec)

##### 1 coating ion exchanger A-m

heptane 100 ml it entered, in separable flask of volume 500 ml, you inserted the dry product 10g of Cellofine Q40ec (tradename, Chisso Corp. (DB 69-064-2582) make) which in range of 60 - 125  $\mu$ m has the particle diameter and used paddle and agitated with velocity of 170 rpm.

Next, in said separable flask, applying 1% cellulose triacetate dimethyl sulfoxide solution 25 ml on 1 hour, it dripped.

After end of dropping addition, 30 min applying methanol 50 ml, it dripped.

Filtering contained liquid of said separable フラ Lycinum chinense Mill. with Buchner funnel, gelled product which it forms inside said liquid it recovered.

Washing & filtering thrice were repeated said gelled product which recovers making use of pure water of 150 ml.

Next, sodium hydroxide water solution 200 ml of 0.5 mol/l you inserted said gelled product after washing in 500 ml separable flask which were inserted and, overnight agitated with 30 deg C.

After churning ending, until filtration with pure water washing and Buchner funnel, filtration liquid becomes neutral, it repeated, acquired the coating ion exchanger A-m.

##### 2 coating ion exchanger A-c

Other than using Cellofine Q40ec (tradename, Chisso Corp. (DB 69-064-2582) make) which for range of 125 - 250  $\mu$ m has particle diameter, coating ion exchanger A-c was manufactured according to the preparation method of 1 coating ion exchanger A-m.

## 3 被覆イオン交換体 A-ec

粒径が 210~350  $\mu\text{m}$  の範囲にあるセルロファイン Q40ec(商品名、チッソ(株)製)を用いた以外は、1 被覆イオン交換体 A-m の調整方法に準じて被覆イオン交換体 A-ec を調製した。

[0020]

## 実施例 2(被覆イオン交換体 B の調製)

過硫酸アンモン 0.1%水溶液 100ml の入った 500ml のセパラブルフラスコに、粒径が 210~350  $\mu\text{m}$  の範囲にあるセルロファイン Q40ec(商品名、チッソ(株)製)50g をいれ攪拌した。

該セパラブルフラスコの内容液をブフナーロートでろ過して、該液内に生成したゲル状物を回収した。

アクリルアミド 3g とビスメチレンアクリルアミド 0.5g を溶解させたメタノールを 100ml 入れた 500ml セパラブルフラスコに、該ゲル状物をいれ、窒素ガスを吹き込み続けながら、60 deg C で一夜攪拌した。

攪拌終了後、純水洗浄とブフナーロートでのろ過を、ろ過液が中性になるまで繰り返し、被覆イオン交換体 B を得た。

[0021]

## 2.イオン交換容量と牛血清アルブミン吸着量の測定

被覆イオン交換体 A-ec(実施例 1)、被覆イオン交換体 B(実施例 2)のイオン交換容量(以下 IEC)と牛血清アルブミン(以下 BSA)の吸着量を測定した。

なお、比較例 1 として粒径が 210~350  $\mu\text{m}$  の範囲にあるセルロファイン Q40ec(商品名、チッソ(株)製)についてもイオン交換容量と牛血清アルブミンの吸着量を測定した。

測定結果を表 1 に示す。

[0022]

BSA の定量方法は、紫外部の吸光度(280nm)を測定する事によって行った。

BSA 濃度が 1.7mg/ml と 0.85mg/ml の 2 種類の 0.01M リン酸バッファー、pH 7.2 の溶液を準備し、それらの吸光度(280nm)を 1cm 光路の石英セルを使用して測定し検量線を作成した。

## 3 coating ion exchanger A-ec

Other than using Cellofine Q40ec (tradename, Chisso Corp. (DB 69-064-2582) make) which for range of 210 - 350;  $\mu\text{m}$  has particle diameter, coating ion exchanger A-ec was manufactured according to the preparation method of 1 coating ion exchanger A-m.

[0020]

## Working Example 2 (Manufacturing coating ion exchanger B)

In separable flask of 500 ml where ammonium persulfate 0.1% aqueous solution 100 ml enters, Cellofine Q40ec which in range of 210 - 350;  $\mu\text{m}$  has particle diameter (tradename, Chisso Corp. (DB 69-064-2582) make) you inserted 50 g and agitated.

Filtering contained liquid of said separable フラ Lycinium chinense Mill. with Buchner funnel, gelled product which it forms inside said liquid it recovered.

While inserting said gelled product in 500 ml separable flask which methanol which melts the acrylamide 3g and bis methylene acrylamide 0.5g 100 ml were inserted, recording continuing the nitrogen gas, overnight it agitated with 60 deg C.

After churning ending, until filtration with pure water washing and Buchner funnel, filtration liquid becomes neutral, it repeated, acquired the coating ion exchanger B.

[0021]

## 2.ion exchange capacity and measurement of bovine serum albumin adsorbed amount

Coating ion exchanger A-ec (Working Example 1), ion exchange capacity of coating ion exchanger B (Working Example 2) (Below IEC) with the adsorbed amount of bovine serum albumin (Below BSA) was measured.

Furthermore, adsorbed amount of ion exchange capacity and bovine serum albumin was measured concerning Cellofine Q40ec (tradename, Chisso Corp. (DB 69-064-2582) make) where particle diameter is a range of 210 - 350;  $\mu\text{m}$  as Comparative Example 1.

measurement result is shown in Table 1.

[0022]

It did quantification method of BSA, by fact that absorbance (280 nm) of the ultraviolet portion is measured.

BSA concentration prepared solution of 0.01 M phosphoric acid buffer, pH 7.2 of 2 kinds of 1.7 mg/ml and 0.85 mg/ml, using quartz cell of 1 cm light path, measured those absorbance (280 nm) and drew up measuring line.

【0023】

## (1)BSA の吸着量の測定

被覆イオン交換体 A-ec(実施例 1)、被覆イオン交換体 B(実施例 2)および該 Q40ec(比較例 1)をそれぞれ内径 0.5cm のカラムに 5.1cm の高さに充填し、0.01M リン酸バッファー、pH7.2 を 20ml 通液し平衡化をした。

34mg/ml の BSA 0.01M リン酸バッファー、pH7.2 溶液を該カラムに 20ml 添加、20ml/h の速度で通液し、カラム出口の通過液を 100ml ビーカーで受けた。

引き続き、該カラムに 0.01M リン酸バッファー、pH7.2 を 30ml 流し、カラム出口の通過液を同じ 100ml ビーカーで受けた。

この通過液を良く混合して、吸光度(280nm)を測定して、前述の検量線から BSA 濃度を求めた。

BSA の吸着量は下の式 1 から求めた。

結果を表 1 に示した。

式 1 (680mg-(通過液中の BSA 量 mg))/4ml

ここで、680mg は添加した BSA の量であり、4ml はカラムに充填したゲル量である。

【0024】

## (2)IEC の測定

被覆イオン交換体 A-ec(実施例 1)、被覆イオン交換体 B(実施例 2)および該 Q40ec(比較例 1)をそれぞれ 0.5N の塩酸に 30 分浸漬し、その後イオン交換体 A、B および Q40ec を純水で、上澄が中性になるまで洗浄した。

このゲルを凍結乾燥により乾燥した。

乾燥したゲルを 1g 秤量し 0.1N の水酸化ナトリウム 50ml に加え、一夜放置した。

このゲル浸漬アルカリ液の上澄を 10ml 計りとり、フェーノフタレインを指示薬として、0.1N HCl で滴定した。

IEC の算出は下の式 2 によって求めた

式 2 (10ml-(滴定値 ml))×0.1×5×÷1g 単位 meq/g

【0025】

【表 1】

【0023】

## Measurement of adsorbed amount of (1) BSA

Coating ion exchanger A-ec (Working Example 1), coating ion exchanger B (Working Example 2) and said Q40ec (Comparative Example 1) in the column of respective internal diameter 0.5 cm it was filled in height of 5.1 cm, 20 ml passed liquid did 0.01 Mphosphoric acid buffer, pH 7.2 and did equilibration.

BSA 0.01Mphosphoric acid buffer, pH 7.2 solution of 34 mg/ml in said column passed liquid was done with velocity of 20 ml additions and 20 ml/h, passed liquid of column outlet was received with 100 ml beaker.

Continuously, 0.01 Mphosphoric acid buffer, pH 7.2 30 ml were let flow in said column, the passed liquid of column outlet was received with same 100 ml beaker.

Mixing this passed liquid well, measuring absorbance (280 nm), it sought BSA concentration from aforementioned measuring line.

It sought adsorbed amount of BSA from Formula 1 under.

Result was shown in Table 1.

Formula 1 (680 mg- (BSA quantitative mg in passed liquid)) / 4 ml

Here, as for 680 mg at quantity of BSA which is added, 4 ml are gel quantity which is filled in column.

【0024】

## Measurement of (2) IEC

Coating ion exchanger A-ec (Working Example 1), coating ion exchanger B (Working Example 2) and said Q40ec (Comparative Example 1) 30 min was soaked respectively in hydrochloric acid of 0.5 N, after that the ion exchanger A, B and Q40ec were washed until with pure water, supernatant becomes neutral.

This gel was dried with lyophilizing.

1 g measured weight it did gel which it dries and overnight it left in addition to sodium hydroxide 50 ml of 0.1 N.

10 ml you measured supernatant of this gel dipping alkali liquid and took, titration you did with 0.1 N HCl with フェーノ cover lane as indicator.

Calculation of IEC with Formula 2 under seeks

Formula 2 (10 ml- (titration value ml)) X 0.1 X 5 X / 1 g unit meq/g

【0025】

【Table 1】

	IEC meq/g	BSA mg/ml
比較例 1 (Q40ec)	1.8	80
実施例 1 (被覆イオン交換体A)	1.7	81
実施例 2 (被覆イオン交換体B)	1.5	76

[0026]

## 3.細胞懸濁液中の蛋白質回収

## 実施例 3

内径 4cm のカラムに、2.5cm の高さまで実施例 1 の被覆イオン交換体 A-ec を充填し、あらかじめ 0.02M のトリス塩酸バッファー、pH8 を 300ml を流し平行化した。

該カラムに、大腸菌 IFO13500 を LB 培地(ポリペプトン 10g、酵母エキス 5g、NaCl10g/L 水、pH7 に調整)で振盪培養した、培養液に BSA を 50mg/ml の濃度になるように溶解した液を 10ml/min の速度でカラム体積の 10 倍量通液した。

大腸菌培養液を通液した後、0.02M のトリス塩酸バッファー、pH8 310ml を該カラムに通液し、細胞をカラムから洗い流した。

次に、0.5M の NaCl を含む 0.02M のトリス塩酸バッファー、pH8(溶出液)310ml を該カラムに通液し吸着した成分を溶出させた。

カラム出口に可視紫外検出器を置き、細胞の濃度(660nm の吸光度)と、蛋白質の濃度(280nm の吸光度)を測定した。

測定の結果を図 1 に示した。

[0027]

## 比較例 2

被覆イオン交換体 A-ec を原料である粒径が 210~350  $\mu$ m の範囲にあるセルロファイン Q40ec(商品名、チッソ(株)製)とした以外は、実施例 1 に準拠して細胞懸濁液中の蛋白質回収を行った。

細胞の濃度と蛋白質の濃度も実施例 1 に準拠して行い、測定の結果を図 1 に示した。

[0026]

## protein recovery in 3.cell suspension

## Working Example 3

In column of internal diameter 4 cm, to height of 2.5 cm coating ion exchanger A-ec of Working Example 1 it was filled, beforehand tris hydrochloric acid buffer, pH 8 of 0.02 M letflow parallel aligning did 300 ml and and.

liquid which in said column, shaking culture did E. coli IFO 13500 with LBmedium (polypeptone 10g, yeast extract 5g, NaCl10 g/l water, in pH 7 manufacturing), in order to become concentration of 50 mg/ml, melts BSA in the fermentation broth column volume 10 -fold amount passed liquid was done with velocity of 10 ml/min.

passed liquid after doing E. coli fermentation broth, tris hydrochloric acid buffer, pH 8 310 ml of 0.02 M passed liquid wasdone in said column, cell was washed away from column.

Next, tris hydrochloric acid buffer, pH 8 of 0.02 M which include NaCl of 0.5 M (eluate )310 ml passed liquid were done in said column and component which adsorbwas liquated.

visible ultraviolet detector was put in column outlet, concentration of cell (absorbance of 660 nm ) with, the concentration (absorbance of 280 nm ) of protein was measured.

Result of measurement was shown in Figure 1.

[0027]

## Comparative Example 2

Coating ion exchanger A-ec other than Cellofine Q40ec which has particle diameter which is a starting material range of 210 - 350;  $\mu$ m (tradename, Chisso Corp. (DB 69-064-2582 ) make) with making, conforming to the Working Example 1, it recovered in cell suspension protein .

Also concentration of cell and concentration of protein conforming to Working Example 1, it did, showed result of measurement in Figure 1

【0028】

被覆イオン交換体 A-ec は 660nm(濁度:細胞濃度を示す)が 1 に近い値で溶出しており、細胞の吸着が無い事がわかった。

一方該 Q40ec は A660nm の値が 0.7 までしかなく、カラムに細胞が吸着した事が解った、一方タンパク質は 0.5M の NaCl を含む 0.02M のトリス塩酸バッファー、pH8 を流す事で回収された。

【0029】

## 実施例 4

被覆イオン交換体 A-m、被覆イオン交換体 A-c、被覆イオン交換体 A-ec を、それぞれ実施例 3 と同じカラムに充填し、更に実施例 3 で用いた大腸菌の培養液を圧力の上昇見ながらカラムの 4 倍から 20 倍容量を通液した。

被覆イオン交換体 A-m(粒径 60~125  $\mu$ m)では目詰まりを起こし、カラムの圧力が上昇した。

被覆イオン交換体 A-c(粒径 210~250)ではやや目詰まりが起こり操作圧が上昇した。

被覆イオン交換体 A-ec(粒径 125~350)では目詰まりせずに大腸菌がカラムを通過した。

結果を図 2 に示した。

【0030】

660nm は細胞の濃度を表す指標であり、C/Co は 1 に近いほど、細胞がカラムから溶出された事を示す。

またカラム上面に細胞が詰まった場合、間詰まりを起こし、液が流れなくなり圧力は上昇する。

粒径が 210~350  $\mu$ m の範囲にある被覆イオン交換体 A-ec は圧力が上昇せず、更に 660nm の C/Co もほぼ 1 に近く細胞が吸着せず、目詰まりも無い事がわかった。

【0031】

## 【発明の効果】

イオン交換体の表面を非イオン性物質で被覆した被覆イオン交換体であれば、細胞の吸着率が低く、且つ目的有用成分の吸着率が高いことから、該被覆イオン交換体を用いれば、培養液から目的とする有用生成物の分離と精製を、同時に且つ効率よく行うダウンストリームプロセス

measurement in Figure 1.

【0028】

We liquated coating ion exchanger A-ec at value whose 660 nm (turbidity: cell concentration is shown.) are close to 1, it understood that it is not adsorption of cell.

On one hand, as for said Q40ec value of A660 nm, it understood that cell adsorbs into column without up to only 0.7, on one hand protein recovered by fact that tris hydrochloric acid buffer, pH 8 of 0.02 M which include NaCl of 0.5 M is let flow.

【0029】

## Working Example 4

While coating ion exchanger A-m, coating ion exchanger A-c, coating ion exchanger A-ec, being filled in same column, as respective Working Example 3 furthermore rise of pressure looking at fermentation broth of E. coli which is used with Working Example 3, the passed liquid it did of column 20 times capacity from 4-fold.

With coating ion exchanger A-m (particle diameter 60~125  $\mu$ m) clogging happened, pressure of column rose.

With coating ion exchanger A-c (particle diameter 210~250) clogging happened a little and operating pressure rose.

With coating ion exchanger A-ec (particle diameter 125~350) clogging do, E. coli passed column.

Result was shown in Figure 2.

【0030】

As for 660 nm with index which displays concentration of cell, C/Co shows fact that extent and cell which are close to 1 are liquated from column.

In addition when cell is plugged to column upper surface, between plugging happens, liquid stops flowing and pressure rises.

As for coating ion exchanger A-ec where particle diameter is a range of 210 - 350  $\mu$ m pressure did not rise, furthermore C/Co of 660 nm or almost to be close to 1 not to adsorb, it understood that clogging it is not cell.

【0031】

## 【Effects of the Invention】

If is coating ion exchanger which covered surface of ion exchanger with the nonionic substance, adsorption ratio of cell becomes low, from fact that at the same time adsorption ratio of objective useful component is high, said coating ion exchanger is used, separating and refining useful product which is made objective from fermentation broth, with

が可能となる。

simultaneously and Dounce tree  $\Delta$  process which is done efficiently possible.

【図面の簡単な説明】

[Brief Explanation of the Drawing(s)]

【図1】

[Figure 1]

細胞濃度および蛋白質濃度の測定結果

measurement result of cell concentration and protein concentration

【図2】

[Figure 2]

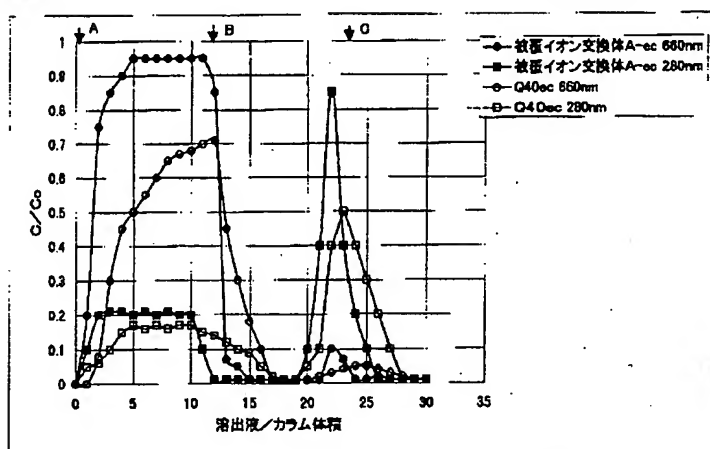
イオン交換体粒径と操作圧との関係

Relationship with ion exchanger particle diameter and operating pressure

Drawings

【図1】

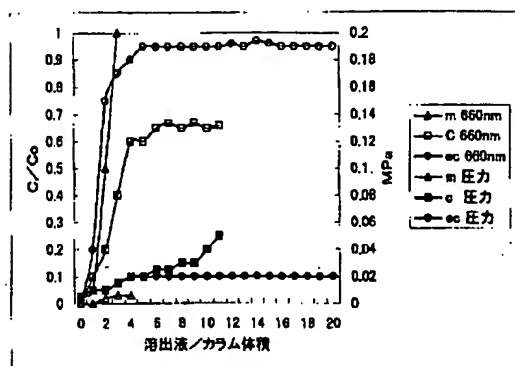
[Figure 1]



A: サンプル添加 B: 0.02Mのトリス塩酸バッファー, pH8  
C: 0.5MのNaClを含む0.02Mのトリス塩酸バッファー, pH8  
C/C0: Cは添加したサンプルの吸光度(660nmあるいは280nm)  
Cは溶出した液の吸光度(660nmあるいは280nm)

【図2】

[Figure 2]



m=粒径60~125 $\mu$ m c=粒径125~250 $\mu$ m

ec=粒径210~350 $\mu$ m

BEST AVAILABLE COPY